

# 2014年度 農学研究科 博士学位請求論文（要旨）

## 下垂体幹・前駆細胞を育むニッチを制御する ephrin/Eph シグナル分子の解析

A study on ephrin/Eph signal molecules in the pituitary stem/progenitor cell niches

学位請求者 生命科学専攻  
吉田 彩舟

### 要旨

下垂体は脳の直下に存在する脊椎動物に共通の内分泌器官である。その構造は腺性下垂体（前葉、中葉）と神経下垂体（後葉）に分かれており、複数のホルモンを産生することで、個体の恒常性維持に寄与している。特に前葉には、5 種類のホルモン産生細胞が存在し、6 種類のホルモンを産生し分泌することで、成長、生殖、代謝、泌乳、ストレス応答など、多くの生体機能を制御している。近年、成体下垂体に存在する非ホルモン産生細胞の一部である幹・前駆細胞が、下垂体組織の再生機構に機能していることが示唆され、注目を集めている。さらに、これら幹・前駆細胞は、生理状態の変化に応じ、特定のホルモン産生細胞を供給することにも寄与しており、下垂体の機能維持に必須と考えられる。しかし、こうした下垂体幹・前駆細胞を制御する機序は未解明である。

本学位論文は、下垂体幹・前駆細胞を育む微小環境（ニッチ）に着目し、ニッチにおける幹・前駆細胞の維持と分化転換の制御機構の解明を目的としたものである。特に、下垂体の幹・前駆細胞ニッチが Tight junction 形成分子である CAR（Coxsackievirus and Adenovirus Receptor）により維持されているという特徴に着目し、細胞間接着を介したシグナル分子である ephrin/Eph receptor (Eph) シグナル分子に焦点を当て、ニッチの制御機序の解析を行った。

本論文は 2 章から構成されており、第 1 章では、研究

の背景を概説した。下垂体の発生過程では、幹・前駆細胞が盛んに増殖し、各種ホルモン産生細胞に分化していく。一方で成体期の下垂体幹・前駆細胞の増殖、分化の頻度は低く、その多くが休止状態で成体下垂体に存在している。近年、幹細胞の特性を利用した複数のアプローチにより、幹・前駆細胞画分の解析、さらに、遺伝子改変動物を用いた細胞運命追跡実験の結果から、SOX2 陽性細胞が多分化能と自己複製能を有する下垂体幹・前駆細胞であることが証明された。

こうした成体組織に存在する幹・前駆細胞は、未分化性や多分化能など、他の細胞とは異なる性質を維持しており、それらの性質を維持するためには、組織中の特別な微小環境（ニッチ）の存在が不可欠と考えられる。最近、我々は、種々の組織においてニッチとの関連が注目されている Tight junction 形成因子 CAR を指標とした解析から、下垂体には Marginal Cell Layer (MCL) と実質層のクラスターという 2 様のニッチが存在することを明らかにしてきた。しかし、下垂体幹・前駆細胞ニッチを制御するシグナル、ならびにニッチの細胞構成など不明な点は非常に多い。一方で、下垂体のニッチが Tight junction により形成されているという特徴は、ニッチの維持機構に細胞間接着が重要な役割を担っている可能性を示唆していると考えられる。そこで、本研究では細胞間接着を介したシグナル伝達分子である ephrin/Eph に着目した。ephrin ならびに Eph は細胞膜上に存在する分子であり、それぞれの分子を発現する細胞間の接着を介し、活性化されるシグナル分子である。また、そのシ

グナルは、*ephrin* ならびに *Eph* を発現する両細胞へ、双方向性に伝達するという特徴があり、腸や脳などのニッチにおいて、幹細胞とそれを支持するニッチ細胞、さらにはニッチ周囲に存在する最終分化細胞間のシグナル分子として、ニッチの制御を担うことが知られている。こうした *ephrin/Eph* の分子的解析は、Tight junction により形成されている下垂体ニッチの制御機構、ならびに細胞構成の解明の糸口になると考えた。

第2章では、遺伝子発現解析ならびに組織化学的な手法を用いて、ラット下垂体幹・前駆細胞ニッチで発現、機能する *ephrin/Eph* 分子の同定を試みた。本研究では、*ephrin/Eph* 分子の中でも、腸や脳の幹細胞ニッチにおいて機能が知られる *ephrin-B* 群とその対合 *Eph* 群に焦点を当て、解析を行った。まず、出生0日目の全下垂体（前、中、後葉）cDNA Library を用いて、3種類の *ephrin-B* (*B1-3*) ならびに、それらと対合する6種類の *Eph* (*A4, B1-4, B6*) の発現を Real-time PCR により解析した。その結果、下垂体組織では *ephrin-B1, B2*、ならびに6種類全ての *Eph* が発現していた。このことから、下垂体において *ephrin-B1* および *B2* を介したシグナルが機能している可能性が推測された。

次に、下垂体幹・前駆細胞ニッチの制御に関与する *ephrin-B* 分子と対合 *Eph* 分子を絞り込むために、遺伝子発現が確認された *ephrin-B1* ならびに *B2* に対する特異抗体を用いて、成熟下垂体（60日齢）における局在を解析した。その結果、*ephrin-B2* 陽性細胞が幹・前駆細胞ニッチである MCL ならびに、前葉の実質層においてクラスター状に局在していることを確認した。次に、成体下垂体における *ephrin-B2* 陽性細胞の特徴を、最終分化細胞マーカー（各種ホルモン）、非ホルモン産生細胞の多くを占める濾胞星状細胞マーカー S100 $\beta$ 、下垂体幹・前駆細胞マーカー SOX2、E-cadherin ならびに CAR 抗体を用いた共染色により解析した。各種ホルモン抗体との共染色の結果から、*ephrin-B2* 陽性細胞は非ホルモン産生細胞であることを確認した。さらに、*ephrin-B2* 陽性シグナルは S100 $\beta$ 、SOX2、E-cadherin、および幹・前駆細胞ニッチのマーカーである CAR と共存することから、*ephrin-B2* 陽性細胞は成体下垂体において、幹・前駆細胞ニッチ特異的に局在していることを確認した。これらの結果は、*ephrin-B2* が下垂体の幹・前駆細胞やそのニッチの機能調節に関与していることを示唆するものと考えられた。

*ephrin* を介するシグナルは、隣接細胞が発現する対合

分子 *Eph* との相互作用によって活性化される。そこで、次に成体下垂体で、*ephrin-B2* 対合分子を発現する細胞の同定を試みた。その結果、*in situ hybridization* により、*EphA4* は下垂体の後葉で特異的に発現していた。また、免疫組織化学的解析から、*EphB1* は前葉の FSH・LH 産生細胞で、*EphB2* は ACTH 産生細胞で特異的な陽性シグナルを確認した。一方で、*EphB3* 陽性シグナルは、前、中葉の MCL に加え、前葉実質層にクラスター状に存在し、*ephrin-B2* や CAR と非常に類似した局在様式を示した。

そこで、*ephrin-B2* と *EphB3* の存在様式を解析するために、細胞新生が穏やかな成体期ならびに、細胞分化や細胞移動が盛んな出生後5日の下垂体を用いて解析を行った。その結果、成体下垂体においては、*ephrin-B2* と *EphB3* 陽性シグナルは両ニッチにおいて、同一細胞の同一面上に存在し、強い極性を示していた。一方で、出生後5日の下垂体では、一部のニッチにおいて、極性を示さない *ephrin-B2* 単独陽性シグナルが出現していた。また、この出生直後に観察される *ephrin-B2* 単独の陽性シグナルを持つ細胞の性質を、分化へと方向付けられたコミットメント細胞のマーカーである転写因子 PIT1 を用いて解析すると、*ephrin-B2* 単独陽性のシグナルを持つ細胞の一部が、PIT1 陽性であり、分化への遷移状態にあることを確認した。これらの結果から、成体下垂体のニッチにおいて、*ephrin-B2* と *EphB3* の存在様式は cis-型であり、不活性型であると考えられる。一方で、分化が盛んな出生直後の下垂体では、*ephrin-B2* 単独の陽性部位が存在することから、隣接する他の対合 *Eph* 発現細胞と trans-interaction（活性型）が可能な状態であると考えられた。

そこで次に、分化が盛んな出生直後の下垂体において、ニッチの周囲に存在し、*ephrin-B2* と trans-interaction を形成する *Eph*、ならびに、その発現細胞の同定を試みた。まず、出生直後のニッチに対して、隣接頻度の高い細胞種を各種ホルモン抗体、または血管内皮細胞の糖鎖と特異的に結合する Isolectin B4 を用いて解析した。その結果、MCL と実質層の両ニッチと接触頻度が高い細胞は、GH 産生細胞と ACTH 産生細胞であった。上述のように、GH 産生細胞に関しては *ephrin-B2* と対合可能な *Eph* は発現していないが、ACTH 産生細胞において *EphB2* の存在を確認している。そこで、出生後5日の下垂体を用いて、*ephrin-B2* と *EphB2* との共染色を行った。その結果、MCL 下層の *ephrin-B2* 単独陽性細胞

が、EphB2 陽性細胞と隣接する像が確認された。

以上の結果から、細胞新生の穏やかな成体期のニッチでは、ephrin-B2 シグナルは cis-interaction により不活性状態であるが、分化の亢進時では、cis-interaction の解除された ephrin-B2 と、ニッチの周囲に存在する主に EphB2 陽性の ACTH 産生細胞との trans-interaction により、ニッチ内部のシグナルが制御されていると考えられる。このように、下垂体のニッチでは cis-interaction を利用したニッチ内部における第 1 次的（抑制的）な制御と、周囲の分化細胞を利用した第 2 次的（活性的）な制御により、幹・前駆細胞の幹細胞性の維持と、分化転換におけるニッチからの離脱が制御されている可能性が示唆された。

本研究により、ephrin/Eph シグナルが下垂体ニッチ

の制御に関与しているという新知見が得られた。中でも、ニッチの研究が先行している腸管や毛包など細胞新生頻度の高い組織のニッチとは異なり、細胞新生頻度の非常に低い下垂体におけるニッチでは、cis-interaction を利用した制御機序の存在が示された。こうした機構は、他のニッチでは報告されておらず、細胞新生頻度の低い組織特有の制御機序である可能性が考えられる。

今後は、こうした知見に基づき、ニッチの単離、モデル細胞を用いた ephrin-B2 シグナルの機能解析ならびに、標的器官除去動物を用いた実験を行うことにより、下垂体ニッチの制御機構が解明できると考えられる。そして、この ephrin/Eph に焦点を当てた下垂体幹・前駆細胞ニッチの研究が、下垂体だけでなく、他の組織におけるニッチの研究の展開に貢献することが期待される。